

Considered
w/ respect
to
English Abstract
of WO 98/55639

~~Not Considered~~

IDS # 2

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : 2 763 959
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : 97 06757
⑤① Int Cl⁸ : C 12 N 15/86, C 12 N 5/10, A 61 K 48/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 02.06.97.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 04.12.98 Bulletin 98/49.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : TRANSGENE SA SOCIETE ANO-
NYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : MEHTALI MAJID, LEROY PIERRE et
MICHOU ANNE ISABELLE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ NOUVEAUX VECTEURS ADENOVIRAUX RECOMBINANTS COMPRENANT UNE SEQUENCE D'EPISSAGE.

⑤⑦ La présente invention a pour objet un vecteur adéno-
viral recombinant délété de tout ou partie de la région E1 et
dans lequel l'une au moins des régions sélectionnées parmi
E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 est non fonctionnelle, ledit vec-
teur adénoviral comportant une cassette d'expression d'un
gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments néces-
saires à son expression dans une cellule hôte ou un orga-
nisme hôte, caractérisé en ce que lesdits éléments
nécessaires à l'expression comprennent au moins une sé-
quence d'épissage. Elle concerne également une cellule
hôte et une particule virale infectieuse comprenant un tel
vecteur, un procédé de préparation d'une telle particule ain-
si que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophy-
lactiques. Enfin elle a trait à une composition
pharmaceutique renfermant ledit vecteur adénoviral, ladite
cellule ou ladite particule virale.

FR 2 763 959 - A1



La présente invention concerne des vecteurs adénoviraux comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et comprenant des séquences d'épissage. Leur
5 présence permet d'augmenter sensiblement l'expression du gène thérapeutique dans une cellule ou un organisme hôte. Elle a également pour objet les cellules et les particules virales infectieuses contenant ces nouveaux vecteurs ainsi qu'une méthode pour les préparer. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

10 La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique dans une cellule ou un organisme hôte. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats-Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Le succès relatif de cette première expérimentation a
15 encouragé le développement de cette technologie pour diverses maladies aussi bien génétiques (dans le but de corriger le dysfonctionnement d'un gène défectueux) qu'acquises (maladies infectieuses, cancers...). A l'heure actuelle, la majorité des protocoles mettent en oeuvre des vecteurs rétroviraux pour transférer et exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter. Cependant, outre leur capacité
20 restreinte de clonage, ils présentent deux inconvénients majeurs qui limitent leur utilisation systématique : d'une part, ils infectent majoritairement les cellules en division et d'autre part, du fait de leur intégration au hasard dans le génome de la cellule hôte, le risque de mutagenèse insertionnelle n'est pas négligeable. C'est pourquoi, de nombreuses équipes scientifiques se sont attachées à développer
25 d'autres types de vecteurs, parmi lesquels les adénovirus.

Mis en évidence dans de nombreuses espèces animales, les adénovirus sont peu pathogènes, non intégratifs et se répliquent aussi bien dans les cellules en division que quiescentes. De plus, ils présentent un large spectre d'hôte et sont capables d'infecter un grand nombre de types cellulaires, notamment les cellules
30 épithéliales, endothéliales, les myocytes, les hépatocytes, les cellules nerveuses et les synoviocytes. En outre, ils possèdent un tropisme naturel pour les voies

- 2 -

respiratoires. Ces propriétés particulières font des adénovirus des vecteurs de choix pour de nombreuses applications thérapeutiques et même vaccinales.

D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire et d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de gènes codant pour les protéines virales et à ses extrémités deux répétitions inversées (désignées ITR pour Inverted Terminal Repeat) et la région d'encapsidation. Les gènes précoces nécessaires à la replication virale sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome (E1 à E4 ; E pour early en anglais) comportant 6 unités transcriptionnelles munies de leur propre promoteur. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) codant pour les protéines de structure, recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais) (voir Figure 1).

Les vecteurs adénoviraux actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont des vecteurs dits de première génération dépourvus de la majeure partie de la région E1 essentielle à la replication, afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. La délétion de la région E3 non essentielle permet d'accroître leur capacité de clonage. Les gènes d'intérêt sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région délétée. Ces virus défectifs pour la replication peuvent être propagés dans une lignée cellulaire complétant la fonction E1. On utilise couramment la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). La délétion de la région E3 non essentielle ne nécessite pas de complémentation particulière. Si la faisabilité du transfert de gènes en utilisant ces vecteurs de première génération est maintenant bien établie, la question de leur innocuité reste posée. Outre les aspects de sécurité (risque de générer des particules compétentes pour la replication), se pose le problème de leur toxicité. En effet, les premiers essais cliniques ont mis en évidence l'induction de réponses inflammatoires dues à l'expression des gènes viraux chez l'hôte s'opposant à la persistance des cellules transduites et à l'expression du transgène. Ces inconvénients liés à la stimulation du système immunitaire de l'hôte par les épitopes

adénoviraux ont justifié la construction de virus de nouvelles générations.

La conception d'un vecteur adénoviral repose d'une part sur le squelette viral et, d'autre part, sur la cassette d'expression du gène thérapeutique associé à des éléments de régulation permettant une expression optimale dans la cellule hôte.

5 Sur le premier point, les vecteurs adénoviraux de seconde génération conservent les régions *en cis* ITRs et séquences d'encapsidation et comportent des délétions internes importantes visant à supprimer l'essentiel des gènes viraux dont l'expression *in vivo* n'est pas souhaitable (voir la demande internationale WO94/28152). Leur propagation est assurée par l'intermédiaire d'un virus
10 auxiliaire ou de lignées cellulaires complétant les fonctions défectives. Par exemple, on utilisera une lignée dérivée de la 293 et exprimant les séquences adénovirales codant pour les protéines essentielles de E4 pour compléter un vecteur de seconde génération dont le squelette génomique est délété des régions E1, E3 et E4.

15 Pour ce qui est de la cassette d'expression, celle-ci comprend généralement en 5' une région promotrice dirigeant la transcription du gène situé à sa suite et, éventuellement en 3', une séquence de polyadénylation (polyA) qui contribue notamment à stabiliser le messager transcrit. Des éléments additionnels peuvent dans certains contextes améliorer l'expression. L'effet positif des séquences
20 introniques sur l'expression génique a déjà été reporté *in vitro* (Buchman et Berg, 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 4395-4405 ; Huang et Gorman, 1990, Nucleic Acid Res. 18, 937-947), *in vivo* dans les animaux transgéniques (Brinster et al., 1988, Proc Natl. Acad. Sci. USA 85, 836-840) et plus récemment dans un contexte vecteur adénoviral de première génération (Connelly et al., 1996, Human Gene Therapy 7,
25 183-195). Ce document démontre que les souris traitées par un adénovirus délété des régions E1 et E3 et exprimant le facteur VIII humain produisent des niveaux 3 à 13 fois plus élevés de facteur VIII sérique lorsque l'ADN complémentaire FVIII comporte des séquences d'épissage.

La présente invention a pour but de mettre à la disposition du public des
30 vecteurs adénoviraux de seconde génération plus efficaces du point de vue de l'expression du gène thérapeutique permettant ainsi de réduire les doses de vecteurs

et d'amplifier l'effet thérapeutique. On a maintenant montré que la présence de séquences d'épissage au sein du gène d'intérêt est bénéfique voire indispensable pour obtenir son expression dans un squelette vecteur adénoviral de seconde génération. Les niveaux d'expression des gènes thérapeutiques facteur IX (FIX) canin et interleukine-2 (IL-2) humaine, sont amplifiés d'un facteur 20 à 150 lorsque la cassette d'expression inclut lesdites séquences d'épissage, alors qu'avec un vecteur de première génération le facteur d'amplification est de 2 à 3. Cette amélioration importante de l'expression génique est inattendue et ne pouvait être déduite de l'état de la technique.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral dérivant du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1 et dans lequel l'une au moins des régions sélectionnées parmi E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 est non fonctionnelle, ledit vecteur adénoviral comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte, caractérisé en ce que lesdits éléments nécessaires à l'expression comprennent au moins une séquence d'épissage.

Au sens de la présente invention, le terme vecteur adénoviral désigne un adénovirus défectif pour la replication (incapable de replication autonome dans une cellule hôte) modifié par rapport à l'adénovirus parental dans la région E1 et au moins l'une des autres régions précoces autres que E3 et/ou tardives. La non fonctionnalité peut être obtenue par délétion totale ou partielle d'une ou plusieurs des régions concernées ou par introduction de mutation(s) (délétion, addition et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides) rendant le gène adénoviral muté défectif. Ces modifications peuvent toucher les séquences codantes du génome viral ou non codantes, notamment les régions promotrices. Pour illustrer ces modes de réalisation, on peut citer la mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, J. Virol. 11, 328-339). Une délétion partielle peut consister en l'élimination de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 6 et 7, qui ne nécessitent pas de complémentation de la fonction E4 (Ketner et al.,

1989, Nucleic Acids Res. 17, 3037-3048). Une délétion totale de E4 couvre l'unité transcriptionnelle complète.

On indique qu'un vecteur adénoviral selon l'invention conserve les régions *en cis* du génome adénoviral à savoir les répétitions inversées terminales (ITR) et la région d'encapsidation. Leur longueur et séquence nucléotidique peuvent varier
5 d'un sérotype à l'autre. Cependant, elles peuvent être aisément isolées à partir des données de la littérature. A titre indicatif, les 458 premiers nucléotides (nt) du génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5) portent l'IRT 5' et la région d'encapsidation et les 103 derniers nt correspondent à l'ITR 3'. Avantageusement,
10 le vecteur adénoviral selon l'invention comprend également les séquences codant pour la protéine pIX à moins qu'elles ne soient complémentées par la lignée de production. Par ailleurs, il peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3. Une autre alternative consiste à conserver les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte,
15 notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, Critical Review of Immunology 10, 53-71). Dans le cadre de la présente invention, on peut avoir recours aux vecteurs dits de seconde génération de l'état de la technique (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119).

Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention est choisi parmi les
20 suivants.

- (1) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E2 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de E3,
- (2) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de E3,
- 25 (3) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de E3, et comportant une mutation non fonctionnelle dans la région E2, et
- (4) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2 et E4 et, de manière optionnelle de tout ou partie de E3.

30 L'origine du vecteur adénoviral selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un

adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3
5 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol., 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jovenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C, notamment de type 2 ou 5. Par ailleurs, le vecteur adénoviral selon la
10 présente invention peut être généré *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par les techniques de biologie moléculaire ou encore par recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale WO96/17070).

Comme indiqué précédemment, le vecteur adénoviral selon l'invention est recombinant et comporte au moins une cassette d'expression d'un gène d'intérêt
15 placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte. Préférentiellement, elle est insérée dans le vecteur adénoviral selon l'invention en remplacement d'une des régions délétées, notamment de E1. Dans le cas où l'on met en oeuvre plusieurs cassettes d'expression, elles peuvent être insérées au même endroit ou à des endroits
20 différents du génome viral, utiliser les mêmes éléments de régulation ou des éléments différents et, éventuellement, être en orientation réverse les unes par rapport aux autres afin de minimiser les phénomènes d'interférence au niveau de l'expression génique.

La caractéristique essentielle de l'une au moins des cassettes d'expression mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention, est de comprendre au moins
25 une séquence d'épissage. Le terme "séquence d'épissage" désigne une séquence habituellement active dans l'épissage d'une séquence intervenante (ivs) située entre deux points d'épissage, présente dans un gène nucléaire entre deux exons et absente de l'ARN messenger (ARNm) correspondant. Les exons sont les segments de
30 séquence qui constituent l'ARNm. Ils peuvent être codants ou non-codants, notamment ceux localisés aux extrémités 5' et 3'. Les points d'épissage représentent

les points frontières entre exon et ivs, le point donneur étant au début de l'ivs et le point accepteur à la fin. Ladite séquence d'épissage comprend au moins les séquences situées directement en 3' du point donneur et en 5' du point accepteur d'épissage et éventuellement une séquence de taille quelconque les séparant. Elle
5 peut également comporter à l'une ou l'autre ou ses deux extrémités des séquences supplémentaires. On mettra de préférence en oeuvre des séquences exoniques, non codantes, intervenant directement dans le processus d'épissage et comprenant les séquences directement en 5' du point donneur et en 3' du point donneur d'épissage. Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux avec un gène d'intérêt de
10 type ADN complémentaire (ADNc). Les séquences intervenant directement dans l'épissage (sites d'épissage recouvrant la jonction exon-ivs) sont relativement bien conservées dans l'évolution et les consensus divulgués dans la plupart des ouvrages de base traitant de l'expression des gènes eucaryotes (par exemple dans Watson et
al., 1989, in Molecular Biology of the Gene, 4 ed, p 683-742 ,
15 Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park, Californie). Notamment, les séquences GT et AG situées respectivement en aval et en amont des points d'épissage 5' (donneur) et 3' (accepteur) sont quasi invariables.

Dans le cadre de la présente invention, on peut envisager d'avoir recours à toute séquence d'épissage dérivant d'un gène quelconque, notamment d'un gène
20 nucléaire transcrit par une ARN polymérase II. Il est connu que de nombreux gènes eucaryotes sont constitués par une succession d'exons et d'introns. On peut citer par exemple les séquences d'épissage dérivant des gènes ovalbumine, α et β -globine, collagène, apolipoprotéine B, facteur VIII et facteur IX de mammifères. Les séquences d'épissage susceptibles d'être mis en oeuvre dans la présente
25 invention peuvent avoir des longueurs et des séquences bien différentes et peuvent être homologues ou hétérologues au gène d'intérêt. Ils peut s'agir d'une séquence d'épissage native telle que trouvée dans la nature. On peut aussi employer une séquence d'épissage modifiée, notamment par la suppression d'une ou plusieurs
30 séquences non actives dans le processus d'épissage, dans le but de réduire sa taille ou d'éliminer des séquences répétées pouvant conduire à des phénomènes de recombinaison ou des séquences de régulation susceptibles de perturber

l'expression du gène d'intérêt. On peut envisager d'utiliser une séquence d'épissage chimère formée de séquences d'origines diverses. Pour illustrer cet aspect, l'intron chimère peut être formé des parties 5' et 3' de deux introns différents ou être muni d'un site donneur d'épissage et/ou d'un site accepteur d'épissage hétérologue. Il est également possible d'avoir recours à une séquence d'épissage synthétique conçu à partir des sites d'épissage consensus. Une séquence d'épissage préférée selon l'invention dérive du second intron du gène β -globine de lapin (Green et al., 1988, Nucleic Acid Res. 16, 369 ; Karasuyama et al., 1989, J. Exp. Med. 169, 13-25), ou de celle trouvée dans le plasmide pCI (Promega Corp, pCI mammalian expression vector E1731) comprenant le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène β -globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur d'épissage du gène d'une immunoglobine de souris.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la cassette d'expression peut comporter une ou plusieurs séquences d'épissage insérées au sein d'un ou plusieurs gènes d'intérêt de type génomique, minigène (type mixte entre génomique et ADNc) ou encore ADNc (dépourvu d'intron) portés par ladite cassette. Le site d'insertion préférentiel de la séquence d'épissage au sein du gène d'intérêt est entre le premier exon et le second exon. Lorsque le gène d'intérêt est de type ADNc, on aura de préférence recours à une séquence d'épissage munie de courtes séquences exoniques pouvant être insérée en 5' ou en 3' de l'ADNc. Le gène d'intérêt peut être homologue ou hétérologue à la cellule hôte et coder pour un ARN antisens, un ribozyme ou un polypeptide d'intérêt de localisation nucléaire, cytoplasmique, membranaire ou sécrété. Il peut s'agir d'un polypeptide natif tel que trouvé dans la nature, d'un fragment fonctionnel, d'un mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées ou encore d'une chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. Le gène d'intérêt peut être obtenu par synthèse chimique ou par clonage (criblage de banque d'ADN à l'aide de sondes appropriées, PCR...) et peut être modifié par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser un gène d'intérêt codant pour une cytokine (interféron α , β ou γ , interleukine (IL),

notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, un facteur nécrosant des tumeurs (TNF), un facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), un récepteur cellulaire (notamment reconnu par le virus HIV), un ligand de récepteur, un facteur de coagulation, une hormone de croissance, une enzyme (uréase, rénine, thrombine...), un inhibiteur d'enzyme (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...), un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II ou un polypeptide agissant sur l'expression des gènes correspondants, un polypeptide capable d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement, un polypeptide marqueur (β -galactosidase, luciférase...) ou tout autre gène d'intérêt ayant un effet thérapeutique pour l'affection ciblée. Plus précisément, dans le but de traiter un dysfonctionnement héréditaire, on utilisera une copie fonctionnelle du gène défectueux, par exemple un gène codant pour le facteur VIII ou IX dans le cadre de l'hémophilie A ou B, la dystrophine dans le cadre des myopathies de Duchenne et Becker, l'insuline dans le cadre du diabète, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) dans le cadre de la mucoviscidose. S'agissant d'inhiber l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers, on mettra de préférence en oeuvre un gène d'intérêt codant pour un ARN anti-sens, un ribozyme, un produit cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique...), un anticorps, un inhibiteur de la division cellulaire ou des signaux de transduction, un produit d'expression d'un gène suppresseur de tumeur (p53, Rb...), un polypeptide stimulateur du système immunitaire, un antigène associé à une tumeur (MUC-1, BRCA-1, antigènes précoces ou tardifs (E6, E7, L1, L2...) d'un virus à papillome HPV...), éventuellement en combinaison avec un gène de cytokine. Enfin, dans le cadre d'une thérapie anti-HIV, on peut avoir recours à un gène codant pour un polypeptide immunoprotecteur, un épitope antigénique, un anticorps (2F5, Buchacher et al., 1992, Vaccines 92, 191-195), le domaine extracellulaire du récepteur CD4 (sCD4 ; Trauneker et al., 1988, Nature 331, 84-86) une immunoadhésine (par exemple un hybride CD4-immunoglobuline IgG ; Capon et al., 1989, Nature 337, 525-531 ; Byrn et al., 1990, Nature 344, 667-670), une

immunotoxine (par exemple fusion de l'anticorps 2F5 ou de l'immunoadhésine CD4-2F5 à l'angiogénine ; Kurachi et al., 1985, *Biochemistry* 24, 5494-5499), un variant trans-dominant, un produit cytotoxique tel que l'un de ceux mentionné ci-dessus ou encore un IFN α ou β .

- 5 Par ailleurs, la cassette d'expression en usage dans la présente invention peut également comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl
- 10 Transférase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

- La locution "éléments nécessaires à l'expression" désigne les éléments génétiques permettant la transcription d'un gène d'intérêt en ARN et la traduction
- 15 d'un ARNm en polypeptide. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut être constitutif ou régulable. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la
- 20 transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de restriction.... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux CMV (Cytomégalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), adénoviral MLP ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase), α 1-
- 25 antitrypsine, CFTR, surfactant (poumon-spécifique), immunoglobuline (lymphocyte-spécifique), actine (muscle-spécifique) ou encore SR α (hybride entre l'origine de SV40 et le LTR de HTLV-I ; Takebe et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.* 8, 466-472). Lorsque la cassette d'expression en usage dans la présente invention comprend plusieurs gènes d'intérêt, ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle des
- 30 mêmes éléments génétiques (cassette polycistronique utilisant un site interne d'initiation de la traduction de type IRES pour réinitier la traduction du second

cistron) ou d'éléments indépendants.

Bien entendu, la cassette peut en outre comprendre des éléments additionnels améliorant l'expression du gène d'intérêt (séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence de polyadénylation, IRES, leader tripartite....) ou encore le maintien dans la cellule hôte (origine de répllication ...). De tels éléments sont connus de l'homme de l'art. Une séquence de polyadénylation préférée dérive du virus SV40 ou encore du gène β -globine de lapin.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux consiste en un vecteur adénoviral dont le génome est délété des régions E1, E3 et E4 dans lequel est insérée à la place de la région E1, une cassette d'expression comportant le promoteur CMV, la séquence d'épissage synthétique isolée du plasmide pCI, l'ADNc codant pour l'IL-2 humaine et le polyA du virus SV40. Une autre variante intéressante est fournie par un vecteur adénoviral de squelette génomique similaire (délétion E1, E3 et E4) comprenant une cassette d'expression formée du promoteur RSV suivi des séquences d'épissage comprenant l'intron 2 du gène β -globine de lapin, de l'ADNc du facteur IX canin et du poly A du gène β -globine de lapin.

L'invention a également trait à une particule virale infectieuse ainsi qu'à une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine et peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée ou non dans le génome. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage ...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste ...), hépatique, pulmonaire, trachéale, épithéliale ou fibroblaste. Une particule virale infectieuse selon l'invention est préparée selon toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art (Graham et Prevect, 1991, *supra*). Plus précisément, le vecteur adénoviral selon l'invention est propagé dans une lignée de complémentation capable de fournir *en trans* les fonctions défectueuses afin de produire les polypeptides nécessaires à la constitution des particules virales infectieuses. On aura notamment recours aux lignées décrites dans la demande internationale WO 97/04119 pour une double complémentation. On peut également employer une

lignée cellulaire appropriée, comme la lignée 293 pour compléter la fonction E1 (Graham et al., 1977, *supra*) et un virus auxiliaire pour compléter le reste des fonctions défectives.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention, selon lequel :

- (i) on introduit ledit vecteur adénoviral selon l'invention dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale infectieuse, et
- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale infectieuse peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium ...).

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur adénoviral, une particule virale infectieuse ou une cellule hôte eucaryote selon l'invention en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies génétiques (hémophilie, diabète, mucoviscidose, myopathie de Duchenne ou de Becker...), de cancers et tumeurs, de maladies virales (l'hépatite B ou C, SIDA, infections herpétiques....).

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale

ou digestive. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, les particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} ufp (unités formant des plaques), avantageusement 10^5 et 10^{13} ufp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} ufp. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral, d'une particule virale infectieuse ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique ...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

Enfin la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'invention, pour améliorer l'expression d'un gène d'intérêt d'un facteur au moins 20, avantageusement d'au moins 50 et, de préférence d'au moins 100 dans une cellule ou un organisme hôte. Le niveau d'amélioration peut être facilement déterminé en comparant l'expression du gène d'intérêt en présence et en absence de ladite séquence d'épissage dans un contexte adénoviral donné.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur adénoviral, d'une particule virale ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

5

La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100) indiquant l'emplacement des différents gènes.

10 **EXEMPLES**

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques
15 générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de recombinaison homologue sont de préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580).
20 S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les techniques d'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications, 1990, édité par Innis,
25 Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

30

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du

métier. Dans les exemples qui suivent, on a recours aux lignées cellulaires 293 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573), LCA-1 (correspondant au clone 5606#5-38 décrit à l'exemple 3 de la demande WO94/04119) et A549 d'origine épithéliale et dérivant d'un carcinome pulmonaire
 5 (ATCC CCL-185). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées.

EXEMPLE 1 : Construction du vecteur adénoviral AdTG6215 exprimant le gène de l'interleukine 2 humaine.

10

On isole du plasmide pCI (Promega) le fragment *BglII-BamHI* portant le promoteur CMV, la séquence d'épissage, un site multiple de clonage (MCS) et la séquence polyA du virus SV40, lequel est inséré dans un plasmide conventionnel. Les séquences ADNc codant pour l'IL-2 humaine (Taniguchi et al., 1983, Nature
 15 302, 305-311) sont isolées sous forme d'un fragment *XhoI-EcoRI* (éventuellement par PCR) et introduites au niveau du MCS. La cassette est clonée en lieu et place de la région adénovirale E1 dans un vecteur de transfert adénoviral, pour donner pTG6601. Le vecteur de transfert comporte les nt 1 à 458 et 3329 à 6241 de l'Ad5 dans un plasmide ppolyII. On génère pTG6215 par recombinaison homologue
 20 entre le fragment *PacI-BstEII* isolé de pTG6601 et le vecteur pTG8595 (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) linéarisé par *ClaI*. Le vecteur adénoviral pTG6215 contient le génome Ad5 dépourvu des régions E1 (nt 459 à 3327), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et la cassette "promoteur CMV-séquence d'épissage de pCI-ADNc IL-2 et pA SV40" insérée à la place des
 25 séquences adénovirales E1.

A titre de témoin, on génère le vecteur pTG6692 en délétant les séquences d'épissage du bloc d'expression isolé de pCI par digestion *PstI* et religation. Le clonage de l'ADNc IL-2 et l'insertion de la cassette "sans intron" au sein du génome adénoviral sont réalisés comme indiqué ci-dessus.

30 Enfin, il est utile de comparer l'effet des séquences d'épissage dans un contexte vecteur adénoviral de première génération. Pour ce faire, le vecteur

pTG6624 est construit par recombinaison homologue entre le fragment *PacI*-*BstEII* isolé de pTG6601 et le vecteur pTG4656 linéarisé par *ClaI*. Ce dernier est équivalent à pTG8595 à la différence qu'il porte une région E4 intégrée, de sorte que la construction finale pTG6624 correspond au génome Ad5 délété des régions
 5 E1 (nt 459 à 3327) et E3 (nt 28592 à 30470) avec la cassette "promoteur CMV-séquence d'épissage de pCI-ADNc IL-2 et pA SV40" insérée à la place de E1. Le vecteur "sans intron" de première génération désigné pTG6229, résulte de la délétion des séquences d'épissage par digestion *PstI* et du clonage de la cassette sans intron dans le génome adénoviral par recombinaison homologue avec le
 10 vecteur pTG4656.

Les adénovirus AdTG6215 et AdTG6692 sont obtenus par transfection du fragment *PacI* isolé des vecteurs correspondants dans les cellules LCA1 par la technique au phosphate de calcium. Les virions de première génération AdTG6624 et AdTG6229 sont produits dans la lignée 293. Les virus sont isolés, propagés et
 15 purifiés dans les conditions habituelles.

Les cellules humaines A549 sont mises en culture puis infectées à confluence par les virions précédents en respectant une multiplicité d'infection d'environ 100. Les quantités d'IL-2 secrétées dans les surnageants de culture récupérés 48 h après l'infection, sont déterminées par ELISA (trousse Quantikine hIL-2, R&D System,
 20 Minneapolis). Dans un contexte vecteur adénoviral de seconde génération (E1⁻, E3⁻ et E4⁻), l'IL-2 est produite en des quantités 100 à 150 fois plus élevées lorsque les virions portent une cassette d'expression munie d'un intron (AdTG6215) que lorsqu'ils en sont dépourvus (AdTG6692). Ces derniers synthétisent des niveaux d'IL-2 très faibles qui ne permettent pas d'envisager leur utilisation thérapeutique.
 25 En comparaison, le facteur d'amplification dans un contexte de virus de première génération (E1⁺, E3⁺) est de 2,5.

EXEMPLE 2 : Construction du vecteur adénoviral AdTG9378 exprimant le gène codant pour le facteur IX canin.

30

Dans un premier temps, on reconstitue la cassette recombinante constituée

du promoteur RSV, de la séquence d'épissage du second intron du gène β -globine de lapin placée en 5' de l'ADNc du FIX canin suivi du polyA du gène β -globine de lapin. Les séquences d'épissage et polyA β -globine sont excisées du vecteur pBCMGNeo (Karasuyama et al., 1989, *supra*) par digestion *SalI-BamHI* et clonées
5 en aval du promoteur RSV porté par le fragment *SalI-BamHI* isolé du vecteur pREP4 (Invitrogen V004-50). Puis on insère en aval des séquences d'épissage, l'ADNc codant pour le FIX canin dont la séquence est décrite dans Evans et al. (1989, Blood 74, 207-212). L'unité de transcription est placée dans un vecteur de transfert qui contient les séquences Ad5 1 à 458 et 3328 à 5778, pour donner
10 pTG9350. Le vecteur adénoviral pTG9378 est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-BglI* isolé de pTG9350 et le vecteur pTG8595 (Chartier et al., 1996, *supra*) linéarisé par *ClaI*. Il contient le génome Ad5 dépourvu des régions E1 (nt 459 à 3327), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et la cassette FIX indiquée ci-dessus insérée en lieu et place de E1.

15 Comme précédemment, on construit un témoin désigné pTG5666 dont l'ossature adénovirale correspond à un vecteur de seconde génération mais dans lequel la cassette FIX est dépourvue de séquences d'épissage, par digestion *PstI*.

De même, on construit deux vecteurs de première génération pTG9370 et pTG9383 différant respectivement par la présence ou non de l'intron 2 β -globine
20 dans la cassette FIX. Le premier est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-BglI* isolé de pTG9350 et le vecteur pTG4656 délété des régions E1 (nt 459 à 3327) et E3 (28592 à 30470), linéarisé par *ClaI*. Le second résulte de la recombinaison entre le fragment *PacI-BglI* dépourvu d'intron et pTG4656.

Les particules virales sont générées par transfection des fragments *PacI* des
25 plasmides précédents dans les lignées 293 (AdTG9370 et AdTG9383) ou LCA1 (AdTG9378 et AdTG5666). Les virus sont isolés, propagés et purifiés dans les conditions habituelles. Les cellules cibles A549 sont mises en culture puis, une fois à confluence, infectées par les virions précédents en respectant une multiplicité d'infection d'environ 100. Les quantités de FIX canins secrétées dans les
30 sumageants de culture récupérés 48 h après l'infection sont déterminées par ELISA (voir par exemple Axelrod et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5173-

24500000.00 276795311.10

Revendications

1. Vecteur adénoviral dérivant du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1 et dans lequel l'une au moins des régions
5 sélectionnées parmi E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 est non fonctionnelle, ledit vecteur adénoviral comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte, caractérisé en ce que lesdits éléments nécessaires à l'expression comprennent au moins une séquence d'épissage.
10
2. Vecteur adénoviral selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage est homologue audit gène d'intérêt.
3. Vecteur adénoviral selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite
15 séquence d'épissage est hétérologue audit gène d'intérêt.
4. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage est munie d'un site donneur d'épissage et/ou d'un site accepteur d'épissage hétérologue à ladite séquence d'épissage.
20
5. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage dérive d'un gène nucléaire eucaryote et notamment du gène ovalbumine, α ou β -globine, collagène, apolipoprotéine B, facteur VIII ou facteur IX de mammifères ou d'une séquence d'épissage synthétique.
25
6. Vecteur adénoviral selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage dérive de l'intron 2 du gène β -globine de lapin ou d'une séquence d'épissage comprenant le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène β -globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur
30 d'épissage du gène d'une immunoglobine de souris.

- 20 -

7. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage est insérée dans ladite cassette d'expression entre le premier exon et le second exon du gène d'intérêt.
- 5 8. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage comprend à l'une et l'autre de ses extrémités une séquence exonique et est insérée dans ladite cassette d'expression en 5' ou 3' du gène d'intérêt, celui-ci étant de type ADNc.
- 10 9. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est en outre dépourvu de tout ou partie de la région E3.
10. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 9, sélectionné parmi le groupe suivant :
- 15 (1) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E2 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- (2) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- 20 (3) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3, et comportant une mutation non fonctionnelle dans la région E2, et
- (4) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2 et E4 et, de manière optionnelle de tout ou partie de la région E3.
- 25 11. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il dérive du génome d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines.
- 30 12. Vecteur adénoviral selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il dérive du

génomme d'un adénovirus humain de type 5.

13. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le gène d'intérêt code pour un ARN antisens, un ribosyme ou un polypeptide d'intérêt thérapeutique sélectionné parmi une cytokine, un récepteur cellulaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le HIV, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.
14. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que lesdits éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte comprennent un promoteur, notamment sélectionné parmi les promoteurs MLP (Major Late Promoter), PGK (Phospho Glycérate Kinase), RSV (Rous sarcoma Virus), SR α et CMV (Cytomégalo virus).
15. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que lesdits éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte comprennent une séquence de polyadénylation, notamment dérivée du virus SV40 ou du gène β -globine de lapin.
16. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 15.
17. Cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 15 ou infectée par une particule virale infectieuse selon la revendication 16.
18. Procédé de préparation d'une particule virale infectieuse selon la revendication 16, selon lequel :

- 22 -

- (i) on introduit un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 15 dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur adénoviral pour obtenir une cellule de complémentation transfectée ;
- 5 (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale infectieuse ; et
- 10 (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.
19. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 15, une particule virale infectieuse selon la revendication 16 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 18 ou une cellule hôte eucaryote selon la revendication 17, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
- 15 20. Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 15, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 16 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 18 ou d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 17, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.
- 20 21. Utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 15, pour améliorer l'expression d'un gène d'intérêt d'un facteur au moins 20, avantageusement d'au moins 50 et, de préférence d'au moins 100 dans une cellule ou un organisme hôte non humain et non animal.
- 25 30

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 546187
FR 9706757

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 94 29471 A (GENETIC THERAPY INC) 22 décembre 1994	1-3,5, 7-21
Y	* page 10, ligne 1 - page 16, ligne 3 * * page 18 - page 19 * * page 37; figure 39; exemples 6B,C,D * * page 51 - page 56; figures 51-59; exemples 9-11 *	4,6
D,Y	--- Promega Catalogue 1996 page 213 Vecteur pCI XP002055416 * le document en entier *	4,6
X	WO 94 12649 A (GENZYME CORP) 9 juin 1994 * page 5, ligne 1-12 * * page 16, ligne 13-16 * * page 17, ligne 16 - page 18, ligne 19 * * page 23; exemple 3 * * page 26, ligne 16-24 *	1,3-5, 9-20
X	EP 0 732 405 A (SUMITOMO PHARMA) 18 septembre 1996 * page 3, ligne 22 - page 6, ligne 44 *	1,3,5,6, 9-20
X A	WO 96 33280 A (UNIV TEXAS) 24 octobre 1996 * page 5, ligne 29 - page 6, ligne 2 * * page 9, ligne 29 - page 10, ligne 8; figure 3 * * page 21, ligne 22-34 * * page 24, ligne 8-13 * * page 26; tableau 1 * * page 28, ligne 11-18 * * page 45 - page 51; revendications *	1,2 9-20
--- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 février 1998		Macchia, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 150 (01.92) (P04C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 546187
FR 9706757

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	CONNELLY S. ET AL.: "High-level tissue specific expression of functional human factor VIII in mice" HUMAN GENE THERAPY, vol. 7, 20 janvier 1996, pages 183-195, XP002055414 * page 184, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 * * abrégé * * page 186, colonne de droite; figure 1 *	1,3,5, 8-21
A	KURACHI S. ET AL.: "Role of intron I in expression of the human factor IX gene" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 10, 10 mars 1995, pages 5276-5281, XP002055415 * abrégé * * page 5278; figure 2 * * page 5280, colonne de droite; tableau II *	1,2,5,7, 21
A	KARASUYAMA H. ET AL.: "ESTABLISHMENT OF MOUSE CELL LINES WHICH CONSTITUTIVELY SECRETE LARGE QUANTITIES OF INTERLEUKIN 2, 3, 4 OR 5, USING MODIFIED CDNA EXPRESSION VECTORS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 18, no. 1, 1 janvier 1988, pages 97-104, XP000565567 * page 99; figure 1A *	6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 février 1998		Macchia, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 546187
FR 9706757

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	US 5 518 913 A (MASSIE BERNARD ET AL) 21 mai 1996 * colonne 6, ligne 5-58 * * colonne 7, ligne 35-39; figure 2 * * colonne 8, ligne 49 - colonne 9, ligne 50 * * colonne 12; exemple 2 * ---	1,3,4,6,8,9,11-20
A	WO 95 16772 A (CORNELL RES FOUNDATION INC ; FALCK PEDERSEN ERIK S (US)) 22 juin 1995 * page 8, ligne 11 - page 9, ligne 4 * * page 16, ligne 25 - page 17, ligne 23 * ---	1,3,5,8,11-15
A	BERKNER K.L.: "DEVELOPMENT OF ADENOVIRUS VECTORS FOR THE EXPRESSION OF HETEROLOGOUS GENES" BIOTECHNIQUES, vol. 6, no. 7, juillet 1988, pages 616-618, 620 - 624, 626, 628, 631, XP002030226 * page 622, colonne de droite, alinéa 1 * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 février 1998		Macchia, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C19)

THIS PAGE BLANK (USPTO)